

PROCEEDING BOOK

Indonesian Society for Allergy and Immunology 9th National Congress

*Joining all the Forces to Tackle Allergy
and Immunologic Diseases*

Surabaya, 6-9 April 2017

ISBN 978-602-95040-7-1



PROCEEDING BOOK

Indonesian Society for Allergy and Immunology 9th National Congress

*Joining all the Forces to Tackle Allergy
and Immunologic Diseases*

Editor :

Yuliasih

Gatot Soegiarto

Surabaya, 6-9 April 2017

**PROCEEDING BOOK
SEMINAR DAN WORKSHOP**

**9th National congress of Indonesian Society for Allergy and Immunology
"Joining all the Forces to Tackle Allergy and Immunologic Diseases"**

Editor :

Yuliasih, Gatot Soegiarto

Editor Pelaksana :

Endang Retnowati, Irmadita Citrashanty, Dominicus Husada, Damayanti, Aryati, Jusak Nugraha, Anang Endaryanto, Cita Rosita Sigit Prakoeswa, Ahmad Suryawan, Hartono, Agung Dwi Wahyu Widodo, Dwi Reno Pawarti, Ari Baskoro, Zahrah Hikmah, Menul Ayu Umborowati, Sylvia Anggraeni

©2017 Departemen - SMF Penyakit Dalam

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga - RSUD. Dr. Soetomo Surabaya

405 + xxiv hal

ISBN : 978-602-95040-7-1

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan bentuk apapun juga tanpa seizin penulis dan Departemen - SMF Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga - RSUD. Dr. Soetomo, Surabaya

Diterbitkan pertama kali oleh :

Departemen - SMF Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga - RSUD. Dr. Soetomo
Surabaya, Maret 2017

of Lupus Nephritis	114
drome and Toxic	121
al Necrolysis (TEN) :	133
	144
rgen Immunotherapy?	151
	160
	161
	177
anagement	180
andung)	182
aria	191
	194
etric Examination	201
	214

26. Apoptosis Mechanisms and its Examinations <i>Dr. dr. Yetti Hernaningsih, Sp.PK</i> (Surabaya)	219
27. Th1 and Th2 Examination <i>dr. Endang Retnowati K, MS, Sp.PK(K)</i> (Surabaya)	227
28. Biologi Th17 dan Tregulator, dan Pemeriksaannya Dengan Flowsitometri <i>dr. Betty A. Tambunan, Sp.PK(K)</i> (Surabaya)	236
29. Differential Diagnosis of Shortness of Breath or Chest Tightness <i>dr. Deasy Fetarayani, Sp.PD, K-AI</i> (Surabaya)	244
30. Diagnostik Asma Bronkial <i>dr. Raveinal, Sp.PD, K-AI</i> (Padang)	250
31. Newly Recommended Vaccine for Adults <i>Dr. dr. Gatot Soegiarto, Sp.PD, K-AI</i> (Surabaya)	260
32. Manifestasi Klinis Dermatitis Atopik <i>dr. Damayanti, Sp.KK</i> (Surabaya)	268
33. Penegakkan Diagnosis pada Dermatitis Atopik <i>dr. Pati Adji, Sp.KK, M.Kes</i> (Bandung)	276
34. Tatalaksana Serba Cakup Untuk Dermatitis Atopik <i>dr. Retno Danarti, Sp.KK(K), PhD</i> (Yogyakarta)	293
35. Pathophysiology and Factors Contributing to Chronic Cough <i>Dr. dr. Laksmi Wulandari, Sp.P(K)</i> (Surabaya)	315
36. Chronic Cough: The Pulmonologist Perspective <i>Dr. dr. Laksmi Wulandari, Sp.P(K)</i> (Surabaya)	322
37. Batuk Kronis : Perspektif Penyakit Dalam <i>dr. Deshinta Putri Mulya, MSc, Sp.PD, K-AI</i> (Yogyakarta)	329
38. Pathogenesis and Clinical Manifestation of Asthma <i>Dr. dr. Daniel Maranatha, Sp.P(K)</i> (Surabaya)	333
39. Management of Asthma and Disease Monitoring <i>Dr. dr. Daniel Maranatha, Sp.P(K)</i> (Surabaya)	342

APOPTOSIS MECHANISMS AND ITS EXAMINATIONS

Yetti Hernaningsih

1. PENDAHULUAN

Proliferasi dan kematian sel diibaratkan dua sisi pada satu mata koin, keduanya terjadi beriringan dalam menjaga homeostasis sel. Sel dapat mengalami kematian karena mereka menjadi tua dan tidak sempurna, keberadaannya berlebihan dibandingkan kebutuhan jaringan atau karena adanya kerusakan sel. Namun hal yang pasti bahwa sel itu sendiri diprogram untuk mati.¹ Berbagai cara kematian sel diantaranya adalah nekrosis, onkosis dan apoptosis. Nekrosis adalah kematian sel karena adanya kerusakan sistem membran akibat aktivitas enzim lisosim. Onkosis adalah kematian sel karena faktor iskemia. Apoptosis adalah kematian sel melalui mekanisme genetik (kerusakan atau fragmentasi DNA).² Istilah apoptosis berasal dari bahasa Yunani yang berarti gugurnya daun dari pohon. Istilah ini digunakan untuk menggambarkan fenomena sel yang berpartisipasi secara aktif pada proses destruksi dirinya sendiri. Apoptosis merupakan suatu proses terprogram yang fisiologis normal secara genetik, untuk membuang sel yang tidak diinginkan. Proses ini terjadi selama perkembangan embrio, untuk menjaga homeostasis jaringan. Apoptosis merupakan program kematian sel melalui proses aktif yang mampu mencegah kelangsungan hidup berbagai sel yang berpotensi ganas melalui kerusakan DNA.^{3,4}

2. DEFINISI DAN PEMBAGIAN

Proses kematian apoptosis ini dibedakan menjadi 2 kelompok sebagai berikut: 1) Apoptosis fisiologis, yaitu kematian sel yang diprogram (*programmed cell death*). Proses kematian ini sangat erat kaitannya dengan suatu enzim yang dikenal dengan telomerase. Pada sel embrional telomerase ini teraktivasi sedangkan pada sel matur telomerase ini tidak teraktivasi. Telomer terletak pada ujung kromosom dan tersusun atas basa yang berulang, berfungsi untuk melindungi kromosom. Pada sel normal, setiap kali terjadi pembelahan sel, maka terjadi pemendekan telomer hingga pada suatu saat telomer ini mencapai titik kritis panjangnya karena berulangnya pembelahan sel. Pada keadaan ini sel tidak dapat melakukan pembelahan lagi dan terjadilah apoptosis fisiologis.

2) Apoptosis patologis yaitu kematian sel karena adanya suatu rangsangan atau jejas. Jejas ini bisa karena bahan karsinogenesis, radioaktif, obat kemoterapi. Proses apoptosis ini dapat melalui beberapa jalur antara lain: aktivitas p-53, jalur sitotoksik, disfungsi mitokondria, kompleks fas dan ligan.²

3. MEKANISME APOPTOSIS

Terdapat sejumlah mekanisme yang dapat menerangkan bilamana apoptosis terjadi pada suatu sel. Sensitivitas sel terhadap berbagai rangsangan dapat

bervariasi tergantung dari sejumlah faktor antara lain ekspresi protein pro dan anti apoptotik, derajat beratnya rangsangan dan tahapan siklus sel. Beberapa rangsangan utama yang dapat menginduksi apoptosis antara lain radikal bebas, stress sitoplasma. Radiasi pengion, dan starvasi serum.⁵

Pada beberapa kasus rangsangan apoptosis terdiri dari sinyal ekstrinsik. Apoptosis jalur ekstrinsik merupakan bentuk kematian sel yang diinduksi oleh signal ekstraseluler, yang menghasilkan ikatan ligan terhadap reseptor-reseptor transmembran spesifik, yang secara kelompok dikenal sebagai reseptor kematian atau *death receptor* (DR), termasuk dalam keluarga TNF/NGF. Ikatan ligan dengan beberapa reseptor molekul secara bersamaan ini akan menyebabkan perubahan konformasi dan membuat kompleks multi protein besar yang disebut *Death Initiation Signaling Complex* (DISC) yang selanjutnya mengaktivasi kaskade kaspase. Dalam hal ini kompleks sinyal FAS/CD95 dapat digunakan sebagai prototipe jalur kematian ekstrinsik. Terjadinya apoptosis melalui jalur ligan dan fas dapat dipicu karena: 1) adanya sel tumor, atau sel yang terinfeksi virus, 2) gangguan hormonal seperti testosteron pada pria atau *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) pada wanita. Pada sel tumor atau sel yang terinfeksi virus, di permukaannya terekspresi suatu protein yang disebut sebagai fas. Sementara itu di dalam tubuh terdapat beberapa sel seperti NK-cell (Natural Killer-cell) dan CTL (Cytotoxic T-Lymphocyte) yang merupakan sistem pertahanan tubuh yang dapat mengekspresikan ligan, sehingga fas pada membran sel yang terinfeksi virus atau di permukaan sel tumor akan diikat oleh ligan yang berada di permukaan NK-cell atau CTL. Ikatan fas dan ligan melalui domain 80 asam amino, yang dikenal sebagai *Death Domain* (DD), suatu molekul adaptor menjadi *Fas-associated protein with a DD* (FADD). FADD mengandung domain protein interaksi lain yang dikenal sebagai *death effector domain* (DED) yang berikatan dengan domain homolog pada caspase 8 dan menyebabkan aktivasinya. Caspase 8 aktif akan mengaktivasi molekul caspase 8 lainnya serta caspase berikutnya seperti caspase 3.^{2,6}

Pada kasus lain apoptosis dapat dipicu adanya sinyal intrinsik. Jalur apoptosis intrinsik diaktivasi sebagai respon terhadap sejumlah kondisi stres termasuk kerusakan DNA, stres oksidatif dan lainnya. Semua bentuk stres ini akan bermuara pada permeabilisasi membran luar mitokondria, menyebabkan hilangnya potensial membran dan selanjutnya menghentikan produksi ATP dan keluarnya sejumlah protein yang berkontribusi pada aktivasi caspase. Setidaknya terdapat 2 mekanisme yang dapat menerangkan bagaimana sinyal-sinyal yang berbeda menyebabkan permeabilisasi membran luar mitokondria. Mekanisme pertama melalui kemampuan membentuk pori-pori oleh beberapa protein keluarga bcl-2 pada membran luar mitokondria. Mekanisme kedua adalah akibat terbukanya membran dalam dari *permeability transition pore complex* (PTPC), yang memerlukan *adenine nucleotide transporter* (ANT) dan *voltage dependent anion channel* (VDAC).⁶

Protein keluarga bcl-2 merupakan regulator penting pada apoptosis jenis ini. Semua yang termasuk keluarga protein bcl-2 ini setidaknya mempunyai 1 domain *bcl-2 homology* (BH). Berdasarkan fungsinya dapat diklasifikasikan

menjadi anggota anti apoptosis bcl-2, bcl-xl, bcl-w, Mcl-1) BH (seperti Bax, Bak, Bcl-2, Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, dengan cara mengganggu pori-pori ataupun melalui ANT. Sedangkan anggota pro apoptosis mempengaruhi agregasi kemudian bermigrasi ke membran pro survival dan melepaskan pro apoptotik sehingga r

Apoptosis juga dapat dipengaruhi oleh enzim granzyme. Granzyme B berikatan dengan *lymphocyte* dan secara la

Mitokondria berpera sebagai proteir. pro apoptosis DIABLO dan sitokrom C. terbantuknya pori pada *Transition (PT) pore*. Pori ini merupakan keluarga bcl-2 pro apoptosis seperti stres sel, kerusakan Mitokondria memegang p dari reseptir kematian d apoptotik bcl-2, yaitu Bcl

Protein bcl-2 adalah diantaranya ada yang berfungsi anti apoptotik. Semua protein ini berfungsi pada keseimbangan antara pro dan anti apoptosis terdapat protein pro apoptosis ketika protein anti apoptosis. Keberadaan protein pro apoptosis diperlukan untuk pembalasan ditemukan dalam sitosol stres sel. Begitu terjadi stres sel membran mitokondria, yang ini berlokasi. Interaksi antara fungsi normal protein bcl-2 pori membran mitokondria terlepas dari ruang intermembran dan mengaktivasi kaskade

Pelepasan sitokrom c menginduksi apoptosis. Sitokrom c berinteraksi dengan protein pro caspase 9 ke dalam

antara lain ekspresi protein pro dan anti apoptosis dalam tahapan siklus sel. Beberapa jenis apoptosis antara lain radikal bebas, irradiasi serum.⁵

Apoptosis terdiri dari sinyal ekstrinsik dan sinyal intrinsik. Sinyal kematian sel yang diinduksi oleh ligan terhadap reseptor ekstraseluler dikenal sebagai reseptor kematian. Ikatan ligan dalam keluarga TNF/NGF. Ikatan ligan secara bersamaan ini akan membentuk kompleks multi protein besar yang disebut DISC (DISC) yang selanjutnya membentuk kompleks sinyal FAS/CD95 dapat mengaktifkan apoptosis melalui sinyal intrinsik. Terjadinya apoptosis melalui sinyal intrinsik sel tumor, atau sel yang terinfeksi virus, atau pada pria atau *Folicle Stimulating* hormone atau sel yang terinfeksi virus, disebut sebagai fas. Sementara itu, sel NK-cell (Natural Killer-cell) dan CTL (Cytotoxic T-lymphocyte) sistem pertahanan tubuh yang dapat menghancurkan membran sel yang terinfeksi virus atau ligan yang berada di permukaan sel melalui domain 80 asam amino, suatu molekul adaptor menjadi ADD mengandung domain protein death domain (DED) yang berikatan dengan ligan menyebabkan aktivasinya. Caspase 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

Apoptosis sinyal intrinsik. Jalur apoptosis sejumla kondisi stres termasuk stres sel akan bermuara ke mitokondria, menyebabkan hilangnya produksi ATP dan keluarnya dari caspase. Setidaknya terdapat tiga sinyal-sinyal yang berbeda dari mitokondria. Mekanisme pertama beberapa protein keluarga bcl-2 kedua adalah akibat terbukanya dari pore complex (PTPC), yang terdiri dari pore complex (PTPC) dan voltage dependent anion

yang penting pada apoptosis jenis ini setidaknya mempunyai 1 jenisnya dapat diklasifikasikan

menjadi anggota anti apoptosis yang mempunyai 3 atau 4 domain BH (seperti bcl-2, bcl-xl, bcl-w, Mcl-1) dan anggota pro apoptosis dengan 2 atau 3 domain BH (seperti Bax, Bak, Bcl-xs, Bok) atau dengan satu saja domain BH (seperti Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, puma). Anggota pro apoptosis menyebabkan apoptosis dengan cara mengganggu integritas membran dengan cara langsung membentuk pori-pori ataupun melalui ikatan pada protein mitokondria seperti VDAC atau ANT. Sedangkan anggota anti apoptosis mencegah apoptosis dengan cara mempengaruhi agregasi anggota pro apoptosis. Protein BH3 yang teraktivasi kemudian bermigrasi ke mitokondria dan selanjutnya mengikat anggota keluarga pro survival dan melepaskan penghalang mereka atau berikatan dengan anggota pro apoptotik sehingga menjadikannya beragregasi.⁶

Apoptosis juga dapat diinduksi oleh *cytotoxic T-lymphocyte* menggunakan enzim granzyme. Granzyme B dapat dikirimkan ke dalam sel oleh *cytotoxic T-lymphocyte* dan secara langsung dapat mengaktifasi caspase 3, 7, 8 dan 10.⁵

Mitokondria berperan penting dalam regulasi kematian sel, mengandung berbagai protein pro apoptotik seperti *Apoptosis Inducing Factor* (AIF), Smac/DIABLO dan sitokrom C. Faktor-faktor ini dilepaskan oleh mitokondria setelah terbentuknya pori pada membran mitokondria yang disebut *Permeability Transition (PT) pore*. Pori-pori ini terbentuk karena kerja dari protein anggota keluarga bcl-2 pro apoptotik, yang teraktivasi karena adanya sinyal apoptosis seperti stres sel, kerusakan radikal bebas atau hilangnya faktor pertumbuhan. Mitokondria memegang peranan penting dalam melipatgandakan sinyal apoptotik dari reseptor kematian dengan reseptor caspase 8 mengaktifkan protein pro apoptotik bcl-2, yaitu Bid.⁵

Protein bcl-2 adalah keluarga protein yang terlibat dalam apoptosis, diantaranya ada yang berperan sebagai pro apoptotik dan sebagian lainnya berfungsi anti apoptotik. Sensitivitas sel terhadap rangsangan apoptosis tergantung pada keseimbangan antara protein bcl-2 pro apoptotik dan anti apoptotik. Ketika terdapat protein pro apoptotik berlebih maka sel lebih sensitif terjadi apoptosis, ketika protein anti apoptosis berlebih maka sel cenderung akan lebih resisten. Keberadaan protein pro apoptotik berlebih pada membran mitokondria penting diperlukan untuk pembentukan pori PT. Protein pro apoptotik bcl-2 sering ditemukan dalam sitosol dan protein ini berperan sebagai sensor kerusakan atau stres sel. Begitu terjadi stres sel, protein pro apoptotik ini bergerak kembali ke membran mitokondria, yang merupakan tempat di mana protein anti apoptotik ini berlokasi. Interaksi antara protein pro dan anti apoptotik ini mengganggu fungsi normal protein bcl-2 anti apoptotik dan menyebabkan pembentukan pori-pori membran mitokondria sehingga sitokrom c dan molekul pro apoptotik terlepas dari ruang intermembran. Hal ini menyebabkan pembentukan apoptosome dan mengaktifasi kaskade caspase.⁵

Pelepasan sitokrom c dari mitokondria merupakan bagian penting dalam induksi apoptosis. Setelah sitokrom c terlepas ke dalam sitosol, dia dapat berinteraksi dengan protein yang disebut Apaf-1. Hal ini menyebabkan perekrutan pro caspase 9 ke dalam kompleks multi protein dengan sitokrom c dan Apaf-1

yang disebut apoptosom. Pembentukan apoptosom menyebabkan aktivasi kaspase 9 dan menginduksi apoptosis.⁵

Kejadian apoptosis diawali oleh translokasi membran fosfatidilserin (FS) yang semula berada di permukaan dalam membran menuju permukaan luar. Annexin, merupakan protein pengikat fosfolipid tergantung Ca^{2+} mempunyai afinitas tinggi untuk FS. Annexin V yang berlabel fluorokrom dapat digunakan untuk mendeteksi FS yang terekspos menggunakan flow sitometri. Sel yang mengalami apoptosis melewati serangkaian peristiwa. Proses ini ditandai oleh gambaran morfologi spesifik, termasuk hilangnya membran plasma asimetri, gelembung pada membran, kondensasi nukleus dan sitoplasma dan pemecahan internukleosom DNA. Hilangnya membran plasma asimetri ini merupakan gambaran apoptosis paling awal. Beberapa peristiwa yang berhubungan dengan apoptosis dapat dianalisis menggunakan flow sitometri. Salah satu peristiwa tersebut adalah membran fosfolipid fosfatidilserin berpindah tempat dari permukaan dalam membran sitoplasmik ke permukaan luar membran, oleh karenanya FS terpapar dengan lingkungan luar sel. Pada permukaan luar, munculnya fosfatidilserin merupakan target untuk fagositosis.⁴

3. PEMERIKSAAN LABORATORIUM APOPTOSIS

3.1 Annexin V/PI

Prinsip:

Annexin V, merupakan protein pengikat fosfolipid tergantung Ca^{2+} berukuran 35-36 kDa dengan afinitas tinggi untuk FS, sehingga dapat mengikat FS pada permukaan sel apoptosis. Pengecatan sel intak dengan annexin V berlabel fluorokrom dapat mendeteksi sel apoptosis pada tahap awal. Gambaran kurva flow sitometri dot plot 2 warna pada sel yang dicat dengan propidium iodide dan annexin V-FITC memungkinkan sel terbagi pada 3 dari 4 kuadran (gambar 1).

Sel yang tidak tercat merupakan sel yang masih hidup dan baik, berada pada area negatif kedua cat, sel tersebut tidak mengekspresikan fosfatidilserin pada permukaannya maupun menyerap propidium iodide melalui membran yang bocor. Sel yang hanya tercat dengan annexin adalah sel yang apoptotik, mereka telah mengekspresikan fosfatidilserin pada permukaannya tetapi belum mengalami proses yang menyebabkan membran sitoplasmanya permeabel. Sel yang tercat dengan propidium iodide dan annexin V merupakan sel nekrotik (mati), mereka menyerap propidium iodide dan annexin V. Pada sel yang permeabel, flowsitometer tidak dapat memberikan informasi kepada kita apakah annexin V berada pada membran luar (karena sel telah mengalami apoptosis sebelum proses permeabilisasi membran) ataukah berada pada membran dalam (karena sel telah mati melalui jalur nekrotik tanpa apoptosis).⁴

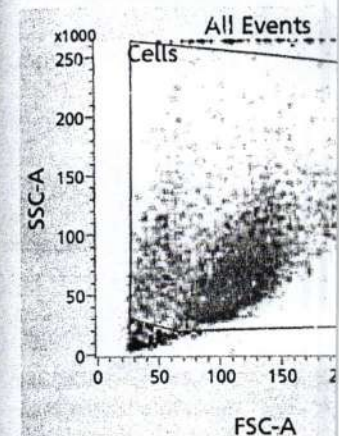
Reagen: Annexin V, propidium iodide (PI) dan bufer pengikat annexin V

Prosedur ringkas:

Sejumlah 1×10^5 sel/ml ditambah reagen annexin V dan PI, divorteks dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit, pada suhu ruang dan tempat gelap, selanjutnya

ditambahkan bufer pengikat flow sitometri dalam waktu

Contoh hasil:



Gambar 1. Diagram scatterplot Technical Data Sheet).⁷

Keterangan gambar:⁷

Annexin V FITC + dan PI -
Annexin V FITC + dan PI -
atau telah mati.

Annexin V FITC - dan PI -
sel apoptosis.

3.2 Pemeriksaan Caspase Prinsip:

Caspase merupakan ke-
utama proses apoptosis. Pro-
dan berada dalam sel dalam
menjadi bentuk enzim aktif s
reseptor kematian mengaktif
8 dan caspase 10. Caspase
kaskade. Kaskade ini pada
caspase 3 dan 6. Caspase
penting, seperti protein sito-
khas yang dijumpai pada s

Salah satu petanda a
unit nukleosom. Caspase t

apoptosom menyebabkan aktivasi

asi membran fosfatidilserin (FS) yang an menuju permukaan luar. Annexin, tung Ca^{2+} mempunyai afinitas tinggi dapat digunakan untuk mendeteksi etri. Sel yang mengalami apoptosis ditandai oleh gambaran morfologi asimetri, gelembung pada membran, pemecahan internukleosom DNA. upakan gambaran apoptosis paling dengan apoptosis dapat dianalisis peristiwa tersebut adalah membran dari permukaan dalam membrane eh karenanya FS terpapar dengan unculnya fosfatidilserin merupakan

PTOSIS

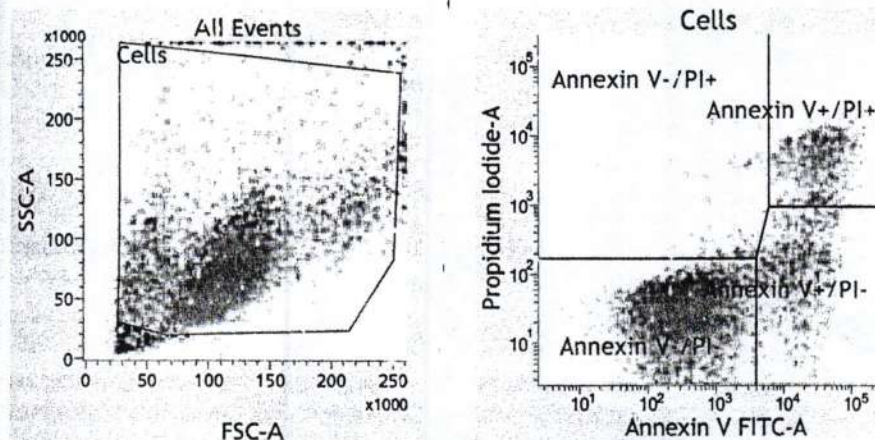
folipid tergantung Ca^{2+} berukuran hingga dapat mengikat FS pada itak dengan annexin V berlabel da tahap awal. Gambaran kurva dicat dengan propidium iodide ada 3 dari 4 kuadran (gambar 1). ih hidup dan baik, berada pada ekspresikan fosfatidilserin pada ide melalui membran yang bocor. sel yang apoptotik, mereka telah annya tetapi belum mengalami anya permeabel. Sel yang tercat akan sel nekrotik (mati), mereka Padas sel yang permeabel, kepada kita apakah annexin V mengalami apoptosis sebelum pada membrane dalam (karena osis).⁴

ufer pengikat annexin V

an PI, divorteks dan selanjutnya dan tempat gelap, selanjutnya

ditambahkan bufer pengikat annexin V dan terakhir diperiksa dan dianalisis dengan flow sitometri dalam waktu 1 jam.

Contoh hasil:



Gambar 1. Diagram scatterplot apoptosis dengan Annexin V FITC dan PI (BD Pharmingen™ Technical Data Sheet).⁷

Keterangan gambar:⁷

Annexin V FITC + dan PI - sedang mengalami apoptosis awal.

Annexin V FITC + dan PI + tahap akhir apoptosis, sedang mengalami nekrosis atau telah mati.

Annexin V FITC - dan PI - sel hidup dan tidak dimasukkan dalam penghitungan sel apoptosis.

3.2 Pemeriksaan Caspae 3

Prinsip:

Caspase merupakan keluarga protein yang merupakan salah satu dari eksekutor utama proses apoptosis. Protein ini termasuk dalam kelompok enzim protease sistein, dan berada dalam sel dalam bentuk inaktif atau zimogen. Zimogen ini dapat dipecah menjadi bentuk enzim aktif setelah terinduksinya apoptosis. Induksi kematian melalui reseptor kematian mengakibatkan aktivasi caspase pemrakarsa antara lain caspase 8 dan caspase 10. Caspase ini selanjutnya dapat mengaktivasi caspase lain dalam kaskade. Kaskade ini pada dasarnya menyebabkan aktivasi caspase efektor, seperti caspase 3 dan 6. Caspase ini bertanggung jawab pada pemecahan protein seluler penting, seperti protein sitoskeletal yang mengakibatkan perubahan morfologi yang khas yang dijumpai pada sel yang mengalami apoptosis.⁵

Salah satu petanda apoptosis adalah pemecahan kromosom DNA menjadi unit nukleosom. Caspase berperan penting pada proses ini dengan mengaktivasi

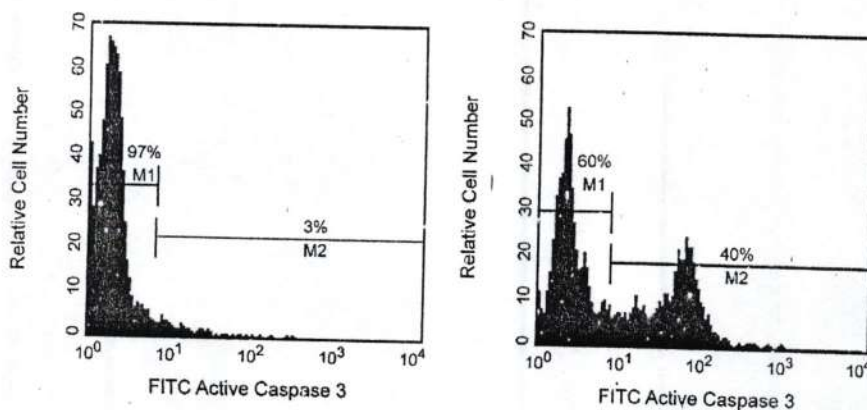
Dnase, menghambat enzim DNA repair, dan memecah struktur protein di dalam nukleus. Peran caspase dalam memecah kromatin melalui cara: 1) menginaktivasi enzim yang terlibat dalam perbaikan DNA, 2) memecah struktur protein inti sehingga terjadi kondensasi protein dan fragmentasi inti, 3) fragmentasi DNA menjadi unit nukleosomal.⁵

Caspase-3 merupakan protease kunci yang diaktivasi selama tahap awal apoptosis dan seperti anggota keluarga caspase yang lain, disintesis sebagai suatu pro-enzim inaktif yang diproses dalam sel yang mengalami apoptosis. Bentuk caspase terdiri dari subunit besar (17-22 kDa) dan kecil (10-12 kDa) yang berhubungan dengan bentuk enzim aktif. Caspase-3 aktif, suatu petanda sel yang mengalami apoptosis, terdiri dari subunit heterodimer 17 dan 12 kDa yang berasal dari proenzim 32 kDa. Antibodi yang dipakai secara spesifik mengenali bentuk aktif caspase-3, bukan bentuk proenzim.⁵

Reagen: Antibodi rabbit anti-active Caspase-3, larutan fiksasi dan permeabilisasi, bufer pencuci

Prosedur ringkas: Sebanyak 1×10^6 sel ditambah larutan fiksasi dan permeabilisasi dan diinkubasi selama 20 menit pada es. Selanjutnya disentrifugasi dan larutan fiksasi dan permeabilisasi dibuang, sel dicuci dengan bufer pencuci pada suhu ruang. Berikutnya ditambahkan antibodi caspase-3 aktif dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan proses pencucian terakhir dan sel dianalisis dengan flow sitometri.

Contoh hasil:



Gambar 2. Pemeriksaan apoptosis dengan caspase-3 pada sel jurkat yang tidak diterapi camptothecin (kiri) dan yang mendapatkan camptothecin (kanan) (BD Pharmingen™ Technical Data Sheet).⁷

3.2 Pemeriksaan PARP/H2AX

Prinsip:

Poly (ADP-ribose) polymerase adalah substrat yang dipecah oleh caspase

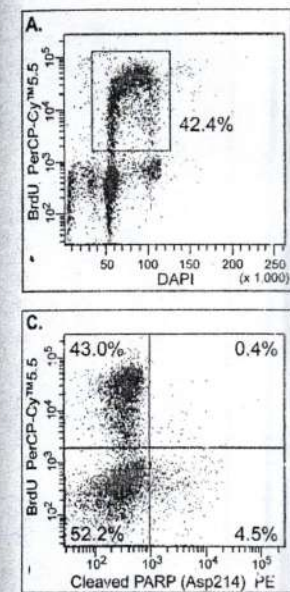
pada proses apoptosis. Rusak akibat bahan mutagen melindungi diri sel.⁸ Sel menjadi 2 fragmen spes

Molekul H2AX adalah kerangka DNA. Pada kerusakan mengaktifkan sekelompok dan *ataxia teleangiectasia* menyebabkan fosforilasi sel bergerak menuju apo

Reagen: Antibodi mouse (4',6-diamidino-2-phenylindol) untuk DNA

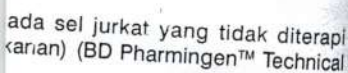
Prosedur ringkas: Sel dan diinkubasi 15-30 menit bufer pencuci, dilanjutkan pada ruangan gelap, suhu bufer pencuci dan dilanj

Contoh hasil:



Gambar 3. Hasil pemeriksaan Kuadran kanan dan atau atas negatif (BD Pharmingen™ Te

lutan fiksasi dan permeabilisasi dan isentrifugasi dan larutan fiksasi dan nuci pada suhu ruang. Berikutnya lusi 30 menit pada suhu ruang. sel dianalisis dengan flow sitometri.



225

Pendahuluan

Hipotesis keseimbangan T-Help/Th2 disebut sebagai kekebalan yang terganggu. Untuk melakukan observasi dua sel T, peneliti melakukan fungsi sitokin pada membran sel. Hasilnya menunjukkan mengusulkan Th1 dan Th2 yang berperan dalam sistem imun. Konsep tersebut digunakan untuk menjelaskan penemuan efek Th1 dan Th2. Pada saat ini telah diidentifikasi sel Th2, yaitu Th17, *follicular helper T cell*, dan *regulatory type 1* (Tr1) dan sel Th1. Sitokin merupakan mediator komunikasi sel, yaitu interferon gamma (IFN- γ) yang merangsang respon imun, dan IL13 merupakan anti-inflamasi. Produksi sitokin tipe 1/tipe 2 oleh sel Th2 telah diimplikasikan pada penyakit autoimun, leukemia dan kanker.^{1,2}

Deteksi sitokin intraselular mengukur kemampuan sel-menggunakan *Flow cyton*

Sel T

Sel makrofag atau dendriti pada permukaannya, hany ke kompleks tersebut. I mensekresikan IL-1 dan IL-2 yang teraktivasi.

Kebanyakan sel Th efektif sebagai sel Th1 dan Th2, tetapi mereka memproduksi sitokin yang lainnya, jadi IFN γ diproduksi oleh Th2 untuk